

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.008

布地奈德在 TGF- β 1 诱导肺成纤维细胞生成 VEGF 中的调节作用陈亚娟¹, 文富强², 汪 涛², 郭述良¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院呼吸内科, 重庆 400016;

2. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室呼吸病学研究室, 成都 610100)

【摘要】目的:研究糖皮质激素布地奈德对转化生长因子- β 1(Transform growth factor- β 1,TGF- β 1)诱导人胎肺成纤维细胞(Human fetal lung fibroblasts-1,HFL-1)分泌血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)的影响及作用机制。方法:体外培养 HFL,以不同浓度布地奈德预处理,再予以 TGF- β 1 刺激,实验结束时收集细胞上清液经酶联免疫法(Enzyme-linked immunosorbent,ELISA)检测 VEGF 含量,收集细胞裂解液经 Western blot 法分别测定磷酸化 ERK MAPK(p-ERK MAPK)、磷酸化 Smad3(p-Smad3)蛋白表达。结果:TGF- β 1 能够刺激 HFL-1 分泌 VEGF,且具有时间和浓度依赖效应($P<0.05$)。高浓度布地奈德对 TGF- β 1 诱导的 VEGF 分泌具有抑制作用($P<0.05$),同时,布地奈德预处理后 p-Smad3 及 p-ERK MAPK 蛋白表达亦明显下调($P<0.05$)。结论:布地奈德可能通过阻止 Smad3/ERK MAPK 信号级联磷酸化从而抑制 TGF- β 1 诱导的 VEGF 分泌,揭示了糖皮质激素在气道炎症疾病中新作用机制。

【关键词】气道重构;布地奈德;转化生长因子- β 1;血管内皮生长因子

【中国图书分类法分类号】R363.2+1

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-04-05

Effect of Budesonide on transform growth factor- β 1 induced vascular endothelial growth factor release by lung fibroblastsCHEN Yajuan¹, WEN Fuqiang², WANG Tao², GUO Shuliang¹

(1. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Respiratory Medicine, State Key Laboratory of Biological Treatment, West China Hospital of Sichuan University)

【Abstract】Objective: To observe the effect of glucocorticoid(Budesonide) on TGF- β 1 induced human fetal lung fibroblasts-1(HFL-1)

作者介绍:陈亚娟(1980-),女,讲师,博士,

研究方向:气道炎症性疾病发病机制研究。

通信作者:郭述良,男,教授,Email:GUOSL999@sina.com。

secretion and vascular endothelial growth factor(VEGF) production and to discuss its mechanism. Methods: HFL-1 were cultured in vitro and were treated with various concentrations

[11] Wang Y, Yang L, Zhang J, et al. Differential MMP-2 activity induced by mechanical compression and inflammatory factors in human synoviocytes[J]. Mol Cell Biomech, 2010, 7(2): 105-114.

[12] Øiestad B E, Engebretsen L, Storheim K, et al. Knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament injury: a systematic review[J]. Am J Sports Med, 2009, 37(7): 1434-1443.

[13] Tang Z, Yang L, Xue R, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts after a mechanical injury: involvement of the p65 subunit of NF- κ B[J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(5): 709-716.

[14] Zhou D, Lee H S, Villarreal F, et al. Differential MMP-2 activity of ligament cells under mechanical stretch injury: an in vitro study on human ACL and MCL fibroblasts[J]. J Orthop Res, 2005, 23(4): 949-957.

[15] Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase re-

search[J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(5): 290-308.

[16] Kim S G, Akaike T, Sasagawa T, et al. Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells[J]. Cell Struct Funct, 2002, 27(3): 139-144.

[17] Wang Y, Tang Z, Xue R, et al. Combined effects of TNF- α , IL-1 β , and HIF-1 α on MMP-2 production in ACL fibroblasts under mechanical stretch: an in vitro study[J]. J Orthop Res, 2011, 29(7): 1008-1014.

[18] Choi Y A, Lee D J, Lim H K, et al. Interleukin-1 β stimulates matrix metalloproteinase-2 expression via a prostaglandin E2-dependent mechanism in human chondrocytes[J]. Exp Mol Med, 2004, 36(3): 226-232.

[19] Cilli F, Khan M, Fu F, et al. Prostaglandin E2 affects proliferation and collagen synthesis by human patellar tendon fibroblasts[J]. Clin J Sport Med, 2004, 14(4): 232-236.

(责任编辑:冉明会)

of Budesonide in the presence of TGF- β 1 stimulation. Post-culture media were collected and VEGF content was tested by enzyme-linked immunosorbent (ELISA). The cell lysates were subjected to Western blot analysis to test the protein expressions of phosphor-ERK MAPK and phosphor-Smad3. **Results:** Budesonide can induce VEGF release by HFL-1 in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Budesonide with high concentration can suppress the TGF- β 1 induced VEGF release ($P<0.05$). The protein expressions of phosphor-ERK MAPK and phosphor-Smad3 were decreased after Budesonide pre-treatment ($P<0.05$). **Conclusions:** Budesonide may reduce TGF- β 1 induced VEGF production in the lung, probably through the Smad/ERK signaling pathway, which may provide new sight into the molecular mechanism underlying glucocorticoids therapy for airway inflammatory diseases.

【Key words】airway remodeling; Budesonide; transform growth factor- β 1; vascular endothelial growth factor

气道重构 (Airway remodeling) 是导致不完全不可逆气流受限的主要原因, 成为临床工作中治疗气道慢性炎症性疾病, 如慢性阻塞性肺疾病 (Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、支气管哮喘的难点^[1]。上皮下纤维化是气道重构重要病理表现之一, 也是造成支气管管腔狭窄、支气管弹性减退和可塑性差的主要原因。转化生长因子- β 1 (Transform growth factor- β 1, TGF- β 1) 在调节上皮下纤维化中发挥关键作用, 通过诱导下游效应因子, 如血管内皮细胞生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子及结缔组织生长因子等的生成, 从而导致上皮下纤维化, 气道管壁增厚, 进而引起气道重构^[2]。

研究表明 VEGF 表达增加与气道壁血管数量增多及面积增大成正比, 而气道黏膜下血管生成是气道重构的另一重要病理表现^[3]。因此, 通过调节 VEGF 的表达从而减轻气道重构形成可能成为延缓气道重构新的靶点。

糖皮质激素在气道炎症性疾病中的抗炎作用众所周知, 而有关是否参与气道重构的相关研究却凤毛麟角^[4]。本实验立足于探讨糖皮质激素在 TGF- β 1 诱导成纤维细胞生成 VEGF 中的作用及信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

纯化的人血小板 TGF- β 1 购自 Pepro Tech 公司; 布地奈德购自 Sigma 公司, 工作浓度 10^{-3} mol/L; 抗磷酸化 ERK MAPK (p-ERK MAPK) 购自 Cell signaling 公司; 抗磷酸化 Smad3 (p-Smad3) 购自 Santa Cruz 公司; VEGF ELISA 试剂盒购自 R&D 公司。

1.2 细胞培养

人胎肺成纤维细胞 (Human fetal lung fibroblasts-1, HFL-1) 购自 ATCC (American type culture collection), 培养于含 10% 胎牛血清的 F-12K 培养基。1 周传代 2 次, 选取第 15~18

代用于实验。

1.3 实验流程

1.3.1 TGF- β 1 调节 HFL-1 细胞分泌 VEGF 的研究 在时间依赖性实验中, 以 0.5 ng/ml TGF- β 1 刺激 HFL-1 细胞, 分别在 12、24、48、72 h 实验结束时收集细胞培养上清液, 进行细胞计数, 经 ELISA 法检测 VEGF 表达; 在浓度依赖性实验中, 以不同浓度 TGF- β 1 (0.025、0.05、0.25、0.5、2.5、5 ng/ml) 刺激 HFL-1 细胞, 72 h 实验结束时收集上清液, 进行细胞计数, 经 ELISA 法检测 VEGF 表达。

1.3.2 布地奈德对 HFL-1 细胞分泌 VEGF 的影响及信号机制研究 HFL-1 细胞分别以不同浓度布地奈德 (10^{-11} 、 10^{-9} 、 10^{-7} mol/L) 预处理, 再予以外源性 TGF- β 1 进行刺激, 实验结束时收集细胞上清液检测 VEGF 表达, 收集细胞裂解液经 Western blot 法检测 p-ERK MAPK、p-Smad3 的表达。

1.4 统计学处理

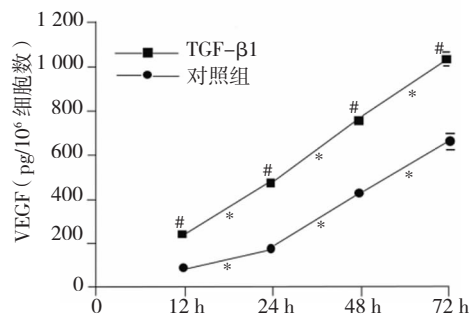
数据统计采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 为计量资料, 采用方差分析。检验水准定为 $P<0.05$ 。

2 实验结果

2.1 外源性 TGF- β 1 对成纤维细胞分泌 VEGF 的影响

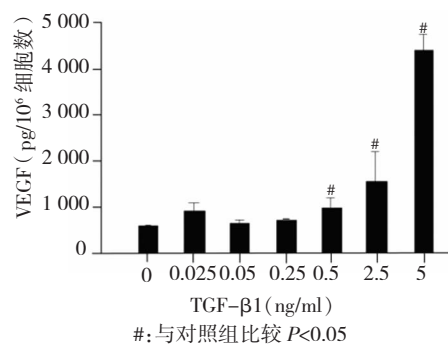
2.1.1 时间依赖性 为观察 TGF- β 1 对成纤维细胞分泌 VEGF 是否具有时间依赖性, 将 0.25 ng/ml TGF- β 1 作用于 HFL-1, 分别在刺激后 12、24、48 h 及 72 h 收集细胞培养上清液, 经 ELISA 法检测 VEGF 浓度。结果显示 TGF- β 1 作用 12 h 时即可检测到 VEGF 基础分泌 (125.12 ± 8.13) pg/ 10^6 细胞数, 随着刺激时间延长, VEGF 基础分泌浓度也随之增加, 在 48、72 h 分别为 (487.46 ± 12.68) pg/ 10^6 细胞数和 (702.6 ± 2.11) pg/ 10^6 细胞数 ($P<0.05$)。实验组予 TGF- β 1 刺激后, 每个时间点与对照组相比 VEGF 含量均明显增多, 并且呈时间依赖性, 尤其是当 TGF- β 1 作用 72 h 时 VEGF 浓度达到最高峰 (图 1)。

2.1.2 浓度依赖性 以不同浓度 TGF- β 1 (0.025~5 ng/ml) 刺激 HFL-1, 作用 72 h 后收集细胞上清液测定 VEGF 浓度。结果显示当 TGF- β 1 浓度 >0.5 ng/ml 时, 随着 TGF- β 1 作用浓度增加, VEGF 分泌量也随之增加, 并且具有浓度依赖性 ($P<0.05$); 当 TGF- β 1 浓度 <0.5 ng/ml 时, 各组 VEGF 分泌与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 2)。



*: 各组连续时间点比较, $P < 0.05$; #: 实验组与对照组比较, $P < 0.05$

图1 TGF- β 1 诱导 HFL-1 分泌 VEGF 的时间依赖性
Fig.1 VEGF secreted by TGF- β 1 induced HFL-1 in a time dependent manner



#: 与对照组比较 $P < 0.05$

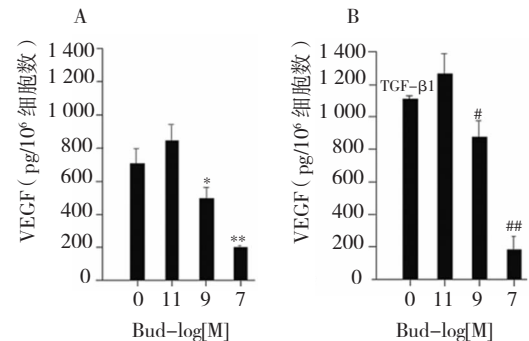
图2 TGF- β 1 诱导 HFL-1 分泌 VEGF 的浓度依赖性
Fig.2 VEGF secreted by TGF- β 1 induced HFL-1 in a dose dependent manner

2.2 布地奈德对 TGF- β 1 诱导人肺成纤维细胞分泌 VEGF 的影响

本研究首先观察了糖皮质激素布地奈德对 HFL-1 分泌基础 VEGF 的影响。结果发现低浓度布地奈德 (10^{-11} mol/L) 不仅不能抑制 VEGF 分泌, 反而还刺激 VEGF 分泌 ($P > 0.05$); 而高浓度 (10^{-9} mol/L 或 10^{-7} mol/L) 则显著抑制基础 VEGF 分泌 ($P < 0.05$), 并且布地奈德浓度越高, 抑制作用越强 (图 3)。

之前的实验结果表明外源性 TGF- β 1 能够刺激 HFL-1 分泌 VEGF。观察布地奈德对 VEGF 分泌的影响发现当高浓

度布地奈德 (10^{-9} mol/L 或 10^{-7} mol/L) 预处理后, 与对照组相比 TGF- β 1 诱导组 VEGF 分泌显著减少, 且具有浓度依赖性, 尤其是 10^{-7} mol/L 布地奈德预处理后, 0.5 ng/ml TGF- β 1 诱导的 VEGF 分泌浓度几乎降至基础水平 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 低浓度 (10^{-11} mol/L) 布地奈德预处理组 VEGF 的分泌无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 3)。

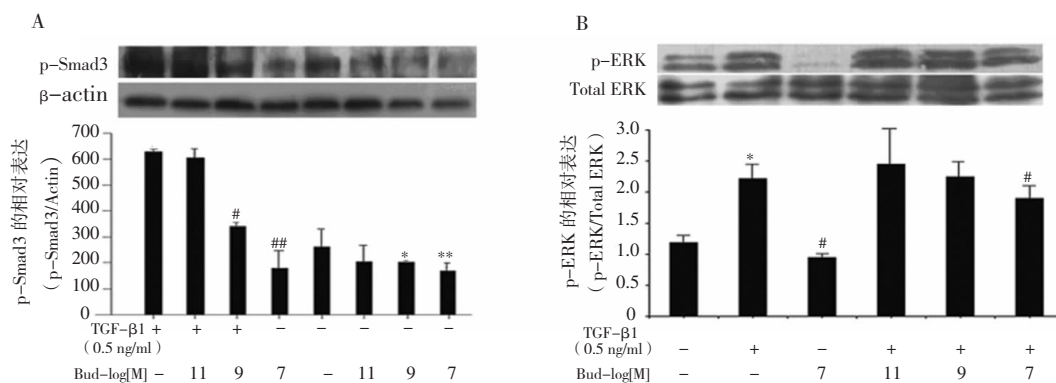


*: 与对照组比较, $P < 0.05$; **: 与布地奈德 (10^{-9} mol/L) 组比较, $P < 0.05$; #: 与 TGF- β 1 组比较, $P < 0.05$; ##: 与 TGF- β 1 + 布地奈德 (10^{-9} mol/L) 组比较, $P < 0.05$

图3 布地奈德对 HFL-1 分泌 VEGF 的影响
Fig.3 Release of VEGF by HFL-1 after Budesonide pretreatment

2.3 布地奈德抑制 Smad3/ERK 信号通路活化

糖皮质激素抑制外源性 TGF- β 1 诱导 HFL-1 分泌 VEGF 的机制尚不明确。研究表明 Smad3 及 ERK-MAPK 信号通路在 TGF- β 1 参与组织修复及生长、凋亡中起着关键作用。为进一步阐明糖皮质激素调节 TGF- β 1 诱导 HFL-1 分泌 VEGF 的作用机制, 提取了细胞总蛋白检测了 p-Smad3、p-ERK MAPK 表达。结果发现 TGF- β 1 刺激细胞后, p-Smad3 蛋白表达水平较对照组比较显著增加, 布地奈德预处理后, p-Smad3 表达明显受到抑制, 且具有浓度依赖性 ($P < 0.05$)。同样, TGF- β 1 刺激细胞后, p-ERK 表达水平亦明显上调, 布地奈德预处理后上调的 p-ERK 表达水平则显著受到抑制, 而且布地奈德浓度越高, 抑制作用越明显 (图 4)。



*: 与对照组比较, $P < 0.05$; **: 与布地奈德 (10^{-9} mol/L) 组比较, $P < 0.05$; #: 与 TGF- β 1 组比较, $P < 0.05$; ##: 与 TGF- β 1 + 布地奈德 (10^{-9} mol/L) 组比较, $P < 0.05$

图4 Smad3/TGF- β 1 及 MAPK 信号蛋白表达

Fig.4 Expression of Smad3 and MAPK signaling protein detected by Western blot

3 讨 论

本实验结果证实外源性 TGF- β 1 刺激 HFL-1 分泌 VEGF,且具有时间和浓度依赖性,而糖皮质激素布地奈德则抑制 TGF- β 1 诱导 VEGF 分泌。同时,布地奈德阻止 TGF- β 1 活化的 p-Smad3 及 p-ERK MAPK 蛋白表达,提示 TGF- β 1 诱导活化的 Smad3/ERK 信号通路在调节 HFL-1 细胞分泌 VEGF 中起着协同作用。

在气道慢性炎症性疾病致病机制中,TGF- β 1 是重要的致纤维化因子,除气道炎症细胞外,许多气道壁结构细胞,包括成纤维细胞均可分泌 TGF- β 1。体外实验亦表明 TGF- β 1 能够刺激包括人气道平滑肌细胞、肺成纤维细胞、鼠巨噬细胞在内的多种细胞分泌 VEGF^[5]。我们的研究结果证实外源性 TGF- β 1 诱导人肺成纤维细胞分泌 VEGF,且具有时间和浓度依赖效应。

糖皮质激素在气道炎症性疾病中发挥的抗炎作用已得到广泛认可,而目前有关糖皮质激素对气道重构的影响及作用机制的研究甚少,尚需进一步探讨。Wen 等^[6]发现糖皮质激素协同 TGF- β 1 促进 HFL-1 调节胶原收缩,这一研究结果可用于解释糖皮质激素为什么对部分纤维化疾病疗效欠佳。另有体内研究证实布地奈德通过减少气道壁周围胶原沉积,从而延缓肺纤维化发生^[7]。这些相互矛盾的实验结果提示糖皮质激素在气道重构中的调节作用比较复杂。本实验发现布地奈德不仅能够抑制 HFL-1 分泌基础 VEGF,对 TGF- β 1 诱导的 VEGF 分泌也有显著抑制作用,提示糖皮质激素在气道炎症性疾病发病机制中可能扮演新的角色。

Smads 蛋白是 TGF- β 1 信号通路重要的细胞内效应蛋白,通过转录激活参与组织损伤后修复^[8],我们的结果亦证实 TGF- β 1 作用后 p-Smad3 蛋白表达水平明显上调,布地奈德预处理后则显著抑制这一作用,且具有浓度依赖性。除了 Smad3 蛋白外,ERK MAPK 信号级联在 TGF- β 1 诱导下游基因活化表达中亦起着关键作用^[9]。本实验发现当 TGF- β 1 刺激细胞 30 min 时就能检测到 p-ERK 蛋白表达。

Funaba 等^[10]研究证实 TGF- β 1 磷酸化激活 ERK MAPK 信号级联不仅可上调 Smad3 蛋白转录活性,还能促进 TGF- β 1 表达,从而进一步增强 TGF- β 1 的放大活化效应。

综上所述,本研究结果表明 TGF- β 1 通过激活 Smad3/ERK MAPK 信号通路诱导 HFL-1 分泌 VEGF,布地奈德阻止 p-Smad3/p-ERK MAPK 从而抑制 TGF- β 1 诱导的 VEGF 分泌。这一研究结果揭示了糖皮质激素在气道炎症疾病中的新的作用及信号转导机制。

参 考 文 献

- [1] Reynold A P, Michael I K, William T G, et al. Airway smooth muscle in bronchial tone, inflammation, and remodeling: basic knowledge to clinical relevance[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(3): 248-252.
- [2] Leask A, Abraham D J. TGF- β signaling and the fibrotic response[J]. *FASEB J*, 2004, 18(7): 816-823.
- [3] Ou X M, Li W C, Wen F Q, et al. VEGFR-2 antagonist SU5416 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(1): 70-79.
- [4] O'Byrne P M, Bisgaard H, Godard P P, et al. Budesonide/formoterol combination therapy as both maintenance and reliever medication in asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171(2): 129-136.
- [5] Massague' J. TGF- β in cancer[J]. *Cell*, 2008, 134(2): 215-230.
- [6] Wen F Q, Skold C M, Liu X D, et al. Glucocorticoids and TGF- β 1 synergize in augmenting fibroblast mediated contraction of collagen gels[J]. *Inflammation*, 2001, 25(2): 109-117.
- [7] Michael R, Peter R A, Michel P B, et al. Dysfunctional interaction of C/EBP α and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(6): 560-574.
- [8] Kobayashi T, Liu X D, Wen F Q, et al. Smad3 mediates TGF- β 1 induction of VEGF production in lung fibroblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327(2): 393-398.
- [9] Dong Q, Lin H Y, Wang H M, et al. Involvement of ERK1/2 Pathway in TGF- β 1-induced VEGF secretion in normal human cytotrophoblast cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 68(2): 198-204.
- [10] Funaba M, Zimmerman C M, Mathews L S. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 41361-41368.

(责任编辑:关蕴良)